

УДК 576.895.121 : 597.554.3 + 577.152

ВЛИЯНИЕ ЗАРАЖЕНИЯ ПЛЕРОЦЕРКОИДАМИ
LIGULA INTESTINALIS НА АКТИВНОСТЬ
ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ И СОДЕРЖАНИЕ
ГЛИКОГЕНА В ТКАНЯХ ЛЕЩА

© Г. И. Извекова, В. В. Кузьмина

Показано, что заражение плероцеркоидами *Ligula intestinalis* существенно влияет на активность пищеварительных ферментов кишечника и содержание гликогена в тканях леща. При этом понижается активность как полостных, так и связанных со слизистой кишечника ферментов. Общая протеолитическая активность снижается сильнее, чем общая амилолитическая активность. Заражение плероцеркоидами *L. intestinalis* вызывает понижение содержания гликогена в мышцах и гепатопанкреасе леща.

Плероцеркоиды *Ligula intestinalis* (L.), обитающие в полости тела рыб — широко распространенные паразиты многих представителей семейства карповых, вызывающие у некоторых из них эпизоотии лигулеза. По мере роста и развития черви наряду с механическим воздействием оказывают токсическое влияние на организм рыбы (Дубинина, 1966). Так, установлено отрицательное влияние плероцеркоидов *L. intestinalis* на картину крови, упитанность и рост, содержание жира и воспроизводительную систему карповых рыб (Arme, Owen, 1968; Курковская, 1978, 1991; Марков и др., 1978; Soutter e. a., 1980; Taylor, Hoole, 1989).

В то же время сведения о влиянии *L. intestinalis* на активность пищеварительных ферментов их хозяев-рыб в доступной нам литературе отсутствуют. Характеристики ферментных систем, не страдающих лигулезом рыб и, в частности леща, изучены достаточно подробно (Кузьмина, 1986, и др.). Известно, что на уровень активности ферментов рыб оказывает влияние большое количество факторов, в том числе характер питания, кормовая база, время года, возраст рыб и т. д. (Уголов, Кузьмина, 1993).

Целью работы было определение влияния заражения плероцеркоидами *L. intestinalis* на активность некоторых пищеварительных ферментов их хозяев — рыб.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служил лещ *Abramis brama* L. Рыбинского водохранилища, не зараженный и зараженный плероцеркоидами цестоды *Ligula intestinalis*, обитающими в полости тела леща. Материал собран в весенний период. Для исследования отбирали рыб одной размерно-возрастной группы (длина по Смитту 16–18 см, возраст 4–5+). В слизистой кишечника леща определяли общую протеолитическую, общую амилолитическую активности и активность сахараразы. Инкубацию

ферментативно активного препарата осуществляли в течение 60 мин при температуре 20°. Общую протеолитическую активность определяли методом Ансона (Anson, 1938) в некоторой модификации по приросту тирозина. В качестве субстрата использовали 1 %-ный раствор казеина, приготовленный на растворе Рингера pH 7.4. Скорость гидролиза субстрата выражали в мкмолях тирозина за 1 мин инкубации в 1 г ткани (усл. ед.). Общую амилолитическую и сахаразную активности определяли модифицированным методом Нельсона (Уголов, Иезуитова, 1969). В качестве субстратов использовали 1.8 %-ный раствор растворимого крахмала и 50, 75, 100, 150 и 200 мМ растворы сахарозы, приготовленные на растворе Рингера, pH 7.4. Скорость гидролиза субстрата выражали в мкмолях глюкозы за 1 мин инкубации в 1 г влажной массы ткани (усл. ед.). Значения константы Михаэлиса (K_m) и максимальной скорости реакции (V) определяли методом двойных обратных величин. Для расчета K_m и V, были применены элементы линейного регрессионного анализа. Содержание гликогена в мышцах и гепатопанкреасе зараженного и незараженного леща определяли по методу Монтгомери с фенолом и серной кислотой (Montgomery, 1957). Содержание гликогена выражали в г гликогена на 100 г влажной массы ткани.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные по влиянию плероцеркоидов *L. intestinalis* на общую протеолитическую и общую амилолитическую активности кишечника леща представлены на рис. 1. Как видно из рис. 1 инвазия *L. intestinalis* существенно влияет на способность хозяина гидролизовать белки и углеводы. Так, общая протеолитическая активность у зараженных лещей по сравнению с незараженными снижается с 16.4 ± 2.2 до 11 ± 1.3 усл. ед. ($P < 0.05$), а общая амилолитическая активность – с 27.5 ± 2.5 до 20.9 ± 2.9 усл. ед. ($P < 0.05$) соответственно. Заражение плероцеркоидами в большей степени оказывается на протеолитической активности рыб. У зараженных рыб уровень общей протеолитической активности снижается на 33 %, в то время как общей амилолитической только на 24.2 %. На основании полученных данных были рассчитаны коэффициенты К/П (активность карбогидраз/активность протеаз). При этом К/П незараженных лещей составил 1.68, зараженных – 1.9. Последнее также свидетельствует о том, что при инвазии лещей *L. intestinalis* изменяется соотношение активностей этих групп ферментов.

Противоположным образом влияет заражение кишечными паразитами *Bothrioserpulus gowkongensis* на активность пищеварительных гидролаз карпа (Давыдов, Курковская, 1991). Этими авторами отмечено некоторое увеличение активности амилазы в кишечнике у зараженных годовиков карпа. Активность протеаз при этом оставалась без изменений. В то же время во внутренних органах годовиков карпа (сердце, печень, почки, кишечник), зараженных *B. gowkongensis*, эти авторы наблюдали снижение активности щелочной и кислой фосфатаз по сравнению с незараженными особями.

Различия во влиянии *L. intestinalis* и *B. gowkongensis* на активность пищеварительных ферментов могут быть связаны как с локализацией гельминтов в теле хозяина, так и с возрастом хозяина и гельминта. В то же время могут сказываться и видовые различия, биохимический состав пищи, разное состояние исследуемых рыб, а также различия в методах определения ферментативной активности. Тем не менее важно отметить, что паразит, обитающий в брюшной полости, сильнее влияет на активность пищеварительных ферментов хозяина, чем кишечный.

Известно, что важную роль в процессах переваривания пищи у рыб, как и у других животных, играет мембранные пищеварение, осуществляющее на струк-

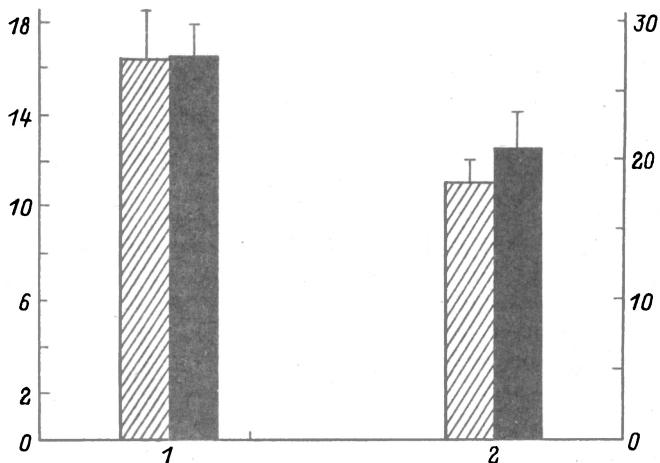


Рис. 1. Влияние *Ligula intestinalis* на активность пищеварительных ферментов леща.

По оси ординат: левая ось — общая протеолитическая активность, заштрихованные столбики, правая ось — общая амилолитическая активность, темные столбики; по оси абсцисс: 1 — незараженный, 2 — зараженный лещи.

Fig. 1. The influence of the *Ligula intestinalis* on the activity of digestive enzymes of the bream.

турах щеточной каймы энтероцитов с помощью адсорбированных из полости кишечника и собственно кишечных ферментов (Кузьмина, 1986; Уголов, Кузьмина, 1993). При этом гидролиз белков и полисахаридов осуществлялся в основном в полости кишечника, а гидролиз дисахаридов — преимущественно на структурах его слизистой оболочки. Установлено, что сахараза является составной частью мембран щеточной каймы энтероцитов, а ее активность на 97–100 % связана со слизистой оболочкой кишечника рыб (Кузьмина, 1986). В связи с этим была определена сахаразная активность в слизистой кишечника у зараженных и не зараженных *L. intestinalis* лещей.

На рис. 2 представлена зависимость активности сахаразы в слизистой кишечника зараженных и не зараженных *L. intestinalis* лещей от концентрации субстрата (сахарозы) в среде. Как видно из рис. 2, активность сахаразы у зараженных лещей несколько ниже, чем у незараженных, особенно заметна разница при концентрации субстрата 50–100 mM. Так, например, при концентрации сахарозы в среде 75 mM активность сахаразы у незараженных рыб составляет 2.91 ± 0.6 усл. ед., а у зараженных — 1.65 ± 0.55 усл. ед. При концентрации сахарозы в среде 50–100 mM активность сахаразы у зараженных лещей снижается на 25–43 %, причем, чем ниже концентрация субстрата, тем заметнее снижается уровень ферментативной активности фермента у зараженных рыб. При концентрации сахарозы 150, 200 mM активность сахаразы у зараженных и незараженных рыб примерно одинакова. При этом существенно то обстоятельство, что у здоровых лещей скорость реакции практически не зависит от концентрации субстрата. Этот факт свидетельствует о том, что у здоровых рыб ферментативная активность подчиняется кинетике Михаэлиса–Ментен. В то время как у лещей, зараженных плероцеркоидами *L. intestinalis*, активность сахаразы не подчиняется этой кинетике (отсутствует эффект насыщения). Константа Михаэлиса является важной кинетической характеристикой фермента, поскольку ее величина отражает сродство фермента к субстрату. Меньшие значения K_m свидетельствуют о большем сродстве фермента к субстрату, т. е. большей эффективности процесса гидролиза субстрата.

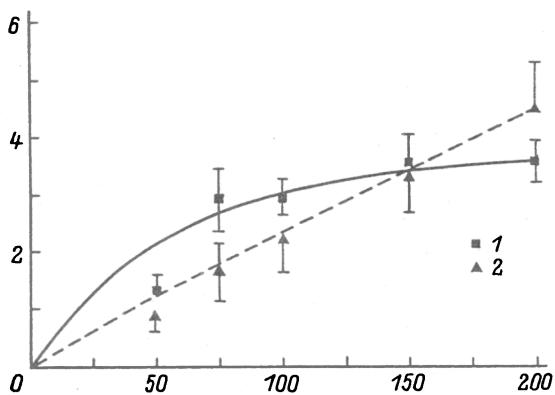


Рис. 2. Зависимость активности сахаразы в слизистой кишечника леща от концентрации субстрата.

По оси абсцисс — концентрация сахарозы, мМ; по оси ординат — активность сахаразы, усл. ед.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 2. The dependence of the saccharase activity in the intestine mucosa of the bream upon the substrate concentration.

Еще более наглядно несоответствие кинетике Михаэлиса—Ментен активности фермента зараженных лещей проявляется на графике двойных обратных величин. На рис. 3 представлена кинетика сахаразной активности у не зараженных и зараженных *L. intestinalis* лещей. На основании полученных данных были вычислены K_m и V для сахаразы здоровой рыбы. При этом K_m составила 84.88 мМ, а V — 4.91 мкмоль/г × мин. Для зараженных рыб кинетические константы не вычисляются. Коэффициенты, определяющие положение прямых у незараженных и зараженных рыб, вычисленные с помощью линейного регрессионного анализа, достоверно отличаются при $P < 0.05$.

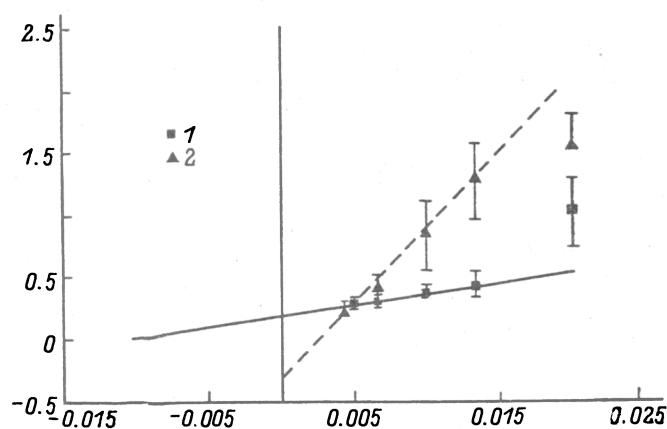


Рис. 3. Кинетика гидролиза сахарозы.

По оси абсцисс — величина, обратная концентрации сахарозы; по оси ординат — величина, обратная скорости реакции.

Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 3. The kinetics of the saccharose hydrolysis.

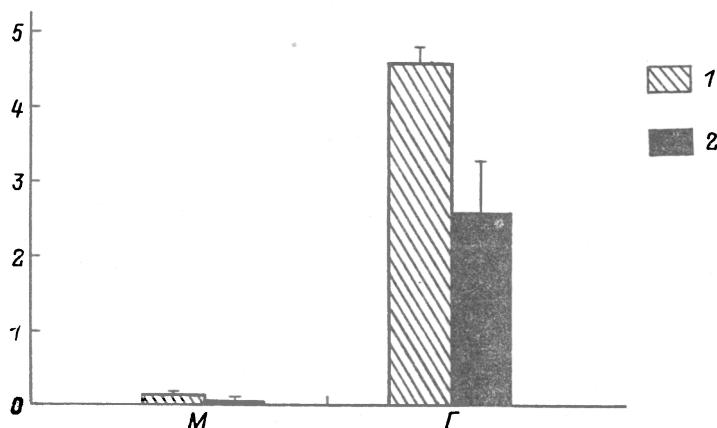


Рис. 4. Содержание гликогена в мышцах и гепатопанкреасе леща.
По оси ординат — содержание гликогена, г/100 г; М — мышцы; Г — гепатопанкреас.
Остальные обозначения такие же, как на рис. 1.

Fig. 4. The glycogen content in muscles and hepatopancreas of the bream.

Все это свидетельствует о том, что заражение плероцеркоидами *L. intestinalis* существенно влияет на пищеварительные ферменты слизистой кишечника леща. При этом понижается активность как полостных, так и собственно кишечных ферментов. Общая протеолитическая активность снижается сильнее, чем общая амилолитическая активность. Вместе с тем показано, что влияние инвазии на активность щеточно-каемной сахаразы при стандартной для определения активности этого фермента концентрации субстрата (50 мМ) более значительно по сравнению с таковым процесса гидролиза полисахаридов. Обнаружено изменение кинетических характеристик собственно кишечного фермента сахаразы.

Гликоген — основной запасной полисахарид и один из основных источников энергии у рыб и других животных. Как известно, гликоген может образовываться как из углеводных, так и из неуглеводных компонентов, однако наиболее часто — из глюкозы, пировиноградной и молочной кислот. Если возникает метаболическая потребность в глюкозе, то происходит ее образование из резервного полисахарида — гликогена при участии трех различных механизмов: 1) фосфоролитического пути, 2) гексозомонофосфатного пути (пентозный шунт), 3) амилолитического пути (Плисецкая, 1975). Поэтому уровень содержания гликогена в организме служит важным показателем жизнедеятельности последнего. Наибольшее количество гликогена у рыб содержится в гепатопанкреасе, мозге и красных мышцах (Плисецкая, 1975). В связи с этим было определено его содержание в гепатопанкреасе и мышцах здоровых и зараженных *L. intestinalis* лещей. Результаты определения представлены на рис. 4. Из рис. 4 видно, что инвазия плероцеркоидами снижает содержание гликогена в мышцах с 0.15 ± 0.02 до 0.07 ± 0.03 г/100 г ткани, а в гепатопанкреасе с 4.6 ± 0.2 до 2.6 ± 0.7 г/100 г ткани ($P < 0.05$). Заражение плероцеркоидами *L. intestinalis* вызывает 57 %-ное понижение содержания гликогена в мышцах и 43.5 %-ное — в гепатопанкреасе.

Следовательно, инвазия *L. intestinalis* сильнее сказывается на содержании гликогена в мышцах рыбы, чем в гепатопанкреасе, также интересно отметить разную степень изменения содержания гликогена в мышцах и гепатопанкреасе у зараженных и незараженных рыб. При этом в мышцах незараженной рыбы гликогена примерно в 31 раз меньше, чем в гепатопанкреасе, в то время как в мышцах зараженной — в 40 раз соответственно.

Таким образом, в результате заражения леща плероцеркоидами *L. intestinalis* изменяется не только уровень содержания, но и соотношение гликогена в исследованных тканях.

По данным Косаревой (1961), содержание гликогена в печени инвазированных *L. intestinalis* леща и плотвы в 2.8–3.7 раза меньше, чем в печени здоровых рыб. Различия в полученных нами и литературных данных скорее всего связаны с различными методическими подходами. Однако тенденция к уменьшению содержания гликогена не вызывает сомнений. Влияние инвазии различных паразитов на уровень содержания гликогена у хозяина показано и для других гельминтов. Так, было установлено, что содержание гликогена в печени карпа зависит от интенсивности инвазии *B. gowkongensis*. С увеличением интенсивности инвазии уровень гликогена в печени рыб снижается (Давыдов, Куровская, 1991). Также показано, что при инвазии *L. intestinalis* у рыб уменьшается размер печени, что связано, по мнению авторов, с редукцией метаболизма жиров и белков. При этом изменяется состав крови и уровня сывороточного белка, что, по-видимому, является частью иммунного ответа рыб (Sweeting, 1977; Arme, Owen, 1968). Снижается темп роста рыбы, степень ее упитанности и плодовитости (Куровская, 1993), аминокислотный и липидный статусы (Сидоров и др., 1989). Изменение поведения зараженных рыб приводит к изменению спектра их питания, а снижение упитанности рыбы обусловлено не только утратой части питательных компонентов, требующихся для поддержания жизнедеятельности самого паразита, но и необходимостью поддержания гомеостаза в ответ на стрессорное воздействие лигул на организм рыбы (Richards, Arme, 1981). По мнению некоторых авторов, поражение рыб *L. intestinalis* сходно с эффектом голодаия (Souutter e. a., 1980). В то же время, несмотря на серьезные нарушения в жизнедеятельности хозяина, поражение *L. intestinalis* не всегда ведет к гибели рыбы. Плероцеркоиды *L. intestinalis* могут жить в хозяине до 3 лет и более (Дубинина, 1966).

В заключение следует отметить, что сложность обсуждения полученных результатов связана с отсутствием в литературе сведений о влиянии плероцеркоидов *L. intestinalis* на показатели, характеризующие поступление в организм хозяина нутриентов, а также состояние его резервов. Полученные в этой работе факты расширяют представления о границах воздействия лигулеза на организм хозяина, так как демонстрируют значительное ухудшение характеристик ферментов, обеспечивающих начальные этапы ассимиляции белковых и углеводных компонентов пищи рыб. При этом эффективность питания рыб снижается приблизительно на треть как за счет уменьшения активности ферментов, так и за счет изменения кинетических характеристик, показанного на примере сахаразы. Оба эти явления представляют большой интерес для понимания механизмов воздействия лигул на организм хозяина. Одновременное снижение концентрации гликогена в мышцах и гепатопанкреасе рыб, а также уменьшение активности пищеварительных гидролаз, в частности карбогидраз, может свидетельствовать об участии в этих процессах гормонов стресса, в частности адреналина. Как указывалось ранее, лигула рассматривается как стрессорный агент (Richards, Arme, 1981). Одна из наиболее характерных реакций организма позвоночных животных на стресс – выброс адреналина и норадреналина (Розен, 1984). Известно, что адреналин снижает концентрацию гликогена в печени и мышцах, а также снижает активность α -амилазы в печени (Плисецкая, 1975). Уменьшение уровня общей амилолитической активности может быть результатом влияния адреналина на α -амилазу, находящуюся в начале ферментативной цепи. Особого внимания заслуживает зависимость активности сахаразы на слизистой кишечника инвазированных лещей от концентрации субстрата, свидетельствующая о принципиальном отличии кинетики сахаразной активности от таковой неинвазированных рыб. Отсутствие феномена насыщения

может свидетельствовать о том, что сахараза инвазированных лещей функционирует как аллостерический фермент. Известно, что у млекопитающих сахараза находится в составе комплексов с мальтазой или изомальтазой (Уголов, Кузьмина, 1993). По всей вероятности, метаболиты паразитов прямо или опосредованно влияют на взаимодействие субъединиц дисахаридазных комплексов, изменяя кинетику процесса гидролиза сахарозы. В настоящее время не ясно, механическое раздражение внутренних органов рыб или какие-либо продукты жизнедеятельности лигул вызывают выявленные изменения характеристик пищеварительных ферментов. По всей вероятности, имеет место и то, и другое. Важно, что паразит, обитающий в полости тела, способен сильнее воздействовать на ферментативный аппарат организма хозяина, чем некоторые кишечные паразиты. Для выяснения механизма воздействия плероцеркоидов *L. intestinalis* требуются дополнительные исследования, учитывающие различные факторы, оказывающие влияние на активность ферментов.

Список литературы

Давыдов О. Н., Курковская Л. Я. Паразито-хозяйственные отношения при цestодозах рыб. Киев: Наукова думка, 1991. 169 с.

Дубинина М. Н. Ремнцы фауны СССР. М.: Л.: Наука, 1966. 261 с.

Косарева Н. А. О нарушении углеводного обмена карповых рыб при инвазиях лигулезом и диграммозом // ДАН СССР. 1961. Т. 139, № 2. С. 510–512.

Кузьмина В. В. Общие закономерности мембранныго пищеварения у рыб и его адаптивные перестройки: Автoref. дис. ... док. биол. наук. Л., 1986. 39 с.

Курковская Л. Я. Изучение трофических связей лентецов и рыб и влияния на них ряда антгельминтиков: Автoref. дис. ... канд. биол. наук. Киев, 1978. 20 с.

Курковская Л. Я. Сопряженность процессов пищеварения в системе *Bothrioccephalus acheilognathus* – карп // Паразитология. 1991. Т. 25, вып. 5. С. 441–449.

Курковская Л. Я. Влияние низших цестод (*Pseudophyllidea*) на жизнедеятельность двухлеток белого амура // Паразитология. 1993. Т. 27, вып. 1. С. 59–68.

Марков Г. С., Кубанцев Б. С., Маркова Е. К., Вахменина В. И., Косарева Н. В. Влияние инвазии ремнечком на морфофункциональные характеристики леща // Экология. 1978. № 2. С. 32–36.

Плисецкая Э. М. Гормональная регуляция углеводного обмена у низших позвоночных. Л.: Наука, 1975. 215 с.

Розен В. Б. Основы эндокринологии. М.: Высш. шк., 1984. 336 с.

Сидоров В. С., Высоцкая Р. У., Смирнов Л. П., Гурьянова С. Д. Сравнительная биохимия гельминтов рыб. Л.: Наука, 1989. 152 с.

Уголов А. М., Иезуитова Н. Н. Определение активности инвертазы и других дисахаридаз // Исследование пищеварительного аппарата у человека (обзор современных методов). Л.: Наука, 1969. С. 192–196.

Уголов А. М., Кузьмина В. В. Пищеварительные процессы и адаптации у рыб. СПб.: Гидрометеоиздат, 1993. 238 с.

Anson M. The estimation of pepsin, trypsin, papain and cathepsin with hemoglobin // J. Gener. Phys. 1938. Vol. 22, N 1. P. 79–83.

Arme C., Owen R. Occurrence and pathology of *Ligula intestinalis* (L.) infections in British fishes // J. Parasit. 1968. Vol. 54. P. 272–280.

Montgomery R. Determination of glycogen // Archs. Biochem. Biophys. 1957. Vol. 67. P. 378–386.

Richards K. S., Arme C. The effect of the plerocercoid larva of the pseudophyllidean cestode *Ligula intestinalis* on the musculature of bream (*Abramis brama*) // Z. Parasitenk. 1981. Vol. 65, N 2. P. 207–215.

Soutter A. M., Walkey M., Arme C. Amino acids in the plerocercoid of *Ligula intestinalis* (Cestoda: Pseudophyllidea) and its fish host, *Rutilus rutilus* // Z. Parasitenk. 1980. Vol. 63, N 2. P. 151–158.

Sweeting R. A. Studies on *Ligula intestinalis*. Some aspects of the pathology in the second intermediate host // J. Fish Biol. 1977. Vol. 10. P. 43–50.

Taylor M., Hoole D. *Ligula intestinalis* (L.) (Cestoda: Pseudophyllidea): plerocercoid-induced changes in the spleen and pronephros of roach, *Rutilus rutilus* (L.) and gudgeon, *Gobio gobio* (L.) // J. Fish Biol. 1989. Vol. 34, N 4. P. 583–596.

THE INFLUENCE OF THE PLEROCERCOID LIGULA INTESTINALIS
INFECTION ON THE ACTIVITY OF DIGESTIVE ENZYMES AND GLYCOGEN
CONTENT IN TISSUES OF THE BREAM

G. I. Izvekova, V. V. Kuz'mina

Key words: *Ligula intestinalis*, bream, enzyme, glycogen.

SUMMARY

The study of the effect of plerocercoid *Ligula intestinalis* infection on activity of digestive enzymes and glycogen content in bream tissues has shown, that the invasion decreases the activity of intestinal cavity enzymes and properly intestinal enzymes. The general proteolitic activity is decreased more than the general amilolitic activity. The kinetic characteristics of the properly intestinal enzyme are changed. The glycogen contents in muscles and hepatopancreas are decreased, and its ratio in these tissues is changed.